

t s3/5

3/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010311704 **Image available**

WPI Acc No: 1995-212962/199528

XRAM Acc No: C95-098382

XRPX Acc No: N95-167147

Human monoclonal antibody - specifically recognises saccharide chain of carcinoembryonic antigen

Patent Assignee: MORINAGA & CO LTD (MOMI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 7126299	A	19950516	JP 93293893	A	19931029	199528 B

Priority Applications (No Type Date): JP 93293893 A 19931029

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 7126299	A	6	C07K-016/18	

Abstract (Basic): JP 7126299 A

Human monoclonal antibody which specifically recognises with saccharide chain of carcinoembryonic antigen (CEA).

Also claimed is hybridoma stain BSRF-S-97.

USE/ADVANTAGE - The antibody is useful for diagnosis and the treatment of cancer. Specifically it is used as imaging agent by combining with radioactive substances to locate tumour, and for missile therapy by combining with antitumour agent.

The antibody pref. belongs to IgG1 class, has kappa chain as a light chain, and is produced by hybridoma BSRF-S-97.

Lymphocyte from enucleated lymph node of a patient with carcinoma of uterine cervix was cultured in RDF medium supplemented with Pokeweed mitogen, was made to fuse with RF-S1 cell, and further cultured in RDF medium which was supplemented with hypoxanthine, aminopterin, and thymidine by substituting the medium with HAT medium every 3-4 days. In two weeks, such hybridoma as determined positive by anti-CEA antibody titration was cloned by limiting dilution analysis to obtain hybridoma BSRF-S-97 for producing antibody S-97. S-97 was found not to react with nonspecific crossreacting antigen (NCA) but to react with CEA only. Also, S-97 was analysed by CELL-ELISA to find that it reacts with tumour cells expressing CEA, but does not react at all with tumour cells expressing no CEA.

Dwg. 4/4

Title Terms: HUMAN; MONOCLONAL; ANTIBODY; SPECIFIC; RECOGNISE; SACCHARIDE; CHAIN; CARCINOEMBRYONIC; ANTIGEN

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C07K-016/18

International Patent Class (Additional): A61K-039/395; C12N-005/10;

C12N-015/02; C12P-021/08; G01N-033/574; G01N-033/577; C12R-001-91

File Segment: CPI; EPI

?

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-126299

(43)公開日 平成7年(1995)5月16日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/18		8318-4H		
C 1 2 N 5/10				
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9050-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 6 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平5-293893

(22)出願日 平成5年(1993)10月29日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年5月1日、
日本産科婦人科学会関東連合地方部会発行の「日本産科
婦人科学会関東連合地方部会会報 第30巻第2号」に発表

(71)出願人 000006116

森永製菓株式会社
東京都港区芝5丁目33番1号

(72)発明者 黒田 和彦

神奈川県横浜市鶴見区北寺尾4-6-1

(72)発明者 塚崎 克己

神奈川県大和市下鶴間22-12

(72)発明者 望月 克巳

神奈川県横浜市神奈川区三ツ沢中町23-33

(72)発明者 加藤 正俊

神奈川県横浜市鶴見区東寺尾東台16-24

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト型モノクローナル抗体

(57)【要約】

【構成】 癌胎児性抗原中の糖鎖を認識することを特徴とするヒト型モノクローナル抗体。

【効果】 本発明による抗CEAヒト型モノクローナル抗体はCEA中の糖鎖部分を特異的に認識するので、放射性物質を結合させ癌患者の腫瘍の位置を調べるイメージング剤、あるいは抗癌物質と本発明抗体を結合させ癌を治療するいわゆるミサイル療法等に应用が可能である。本発明の抗体はヒトに対する抗原性が低いヒト型のモノクローナル抗体であるため、臨床上極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌胎児性抗原中の糖鎖を認識することを特徴とするヒト型モノクローナル抗体。

【請求項2】 免疫グロブリンクラスがIgGに属し、軽鎖がκ鎖であることを特徴とする請求項1に記載のヒト型モノクローナル抗体。

【請求項3】 ハイブリドーマ株 BSRF-S-97によって生産され得る請求項1、2記載のヒト型モノクローナル抗体S-97。

【請求項4】 ハイブリドーマ株 BSRF-S-97。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は人の癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) に結合するヒト型モノクローナル抗体、及び該ヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。CEAに反応するモノクローナル抗体は、癌の診断、治療に有用である。

【0002】

【従来の技術】 CEAはGoldとFreedmann (Gold, P. and Freedmann, S.D.: J. Exp. Med., 121, 439-459 (1965)) によって見いだされた分子量約180キログルトンの糖タンパク質である。正常細胞はCEAを殆ど生産しないが、癌細胞 (特に消化器癌、肺癌、子宮癌等) はCEAを生産する細胞の割合が高いことが知られている。従ってCEAは正常人の血中には殆ど検出されないが、これらの癌患者の血中には高い確率で高濃度に認められる。このことを利用してCEAはラジオイムノアッセイ法や酵素免疫測定法などの抗CEA抗体を利用した血中濃度の測定法により、癌の診断や手術後のモニタリングに腫瘍マーカーとして広く利用されている。また多くの癌細胞がCEAを生産することと抗CEA抗体がこれらの癌細胞に集積することを利用して、アイソトープで標識した抗CEAモノクローナル抗体を癌患者に投与し癌の存在する場所を見いだす方法、即ち癌のラジオイムノイメージング法等にも抗CEA抗体は多く利用されている (Larson, S.M.: Cancer Res., 50, 892s-898s (1990))。

【0003】 このように抗CEA抗体は有用性が高いため、これまでに多数のモノクローナル抗体が作成された (Hammarstrom, S. et al.: Cancer Res., 49, 4852-4858 (1989))。しかしながら従来の抗CEAモノクローナル抗体は、Koda等による1例のヒト型モノクローナル抗体 (Koda, K. et al.: Arch. Surg., 125, 1591-1597 (1990)) を除いてすべてマウスのモノクローナル抗体であった。またKoda等の論文には、得られたヒト型モノクローナル抗体の詳しい特異性が述べられておらず、また得られたヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの抗体産生能等についても述べられていないため、実用上の有用性については不明である。

【0004】 CEAに対するモノクローナル抗体が、C

10 Dtsch. Med. Wochenschr., 113, 374-380 (1988))。このHAMAは投与したマウス型モノクローナル抗体を不活化するばかりでなく、アナフィラキシーショックを引き起こす危険性を有する。この問題を回避するため、たとえばマウス型抗CEAモノクローナル抗体の抗原結合部位とヒト抗体の定常部位を連結した、いわゆるキメラ抗体が作成され (Beidler, C. B., et al.: J. Immunol., 141, 4053-4060 (1988))、HAMAの生成を引き起こす抗原性を除こうとする試みがされているが、マウス抗体に由来する抗原結合部位の抗原性は残っており根本的な解決には至っていない。一方、ヒト型モノクローナル抗体を用いる場合には、このような抗原性の問題ははじめから考えられないため、マウス型より優れている。

【0005】 マウス型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ようとする時には、多くの場合、抗原となる物質あるいは細胞などをマウスの体内に免疫することによって、抗原に感作されたBリンパ球を容易に得ることができるので、これを用いて目的を達することができる。これに対して、倫理的及び保健的な理由から、人体にヒト型モノクローナル抗体を得る目的で積極的な免疫を行うことはできず、所望の特異性を有するヒト型モノクローナル抗体を得ることは困難であった。

【0006】 一方、M. Garcia等は正常大腸と癌細胞に存在するCEAは分子量が異なり、この差異が糖鎖部分の違いに基づくものであることを見いだしている (Garcia, M. et al.: Cancer Res., 51, 5679-5686 (1991))。このことからCEAの糖鎖を認識するモノクローナル抗体は癌の診断、治療に極めて有用と考えられている。

【0007】

40 【発明が解決しようとする課題】 本発明は上記の課題を解決し、これまで取得するのが困難であった抗CEAヒト型モノクローナル抗体を提供することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記の課題に鑑みて鋭意研究の結果、本発明を完成するに至った。

【0009】 即ち、本発明は、CEA中の糖鎖を認識することを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を提供するものである。

【0010】 本発明の抗体は種々の免疫グロブリンクラ

スを取り得る。

【0011】本発明のヒト型モノクローナル抗体は、抗CEA抗体産生ヒトリンパ球を株化し、培養することにより得ることが可能である。

【0012】株化されたリンパ球は、例えば、EBウィルスをリンパ球に感染させ株化する方法、他の株化した細胞株をリンパ球と融合しハイブリドーマを得る方法、もしくはこれらの2つの方法を組み合わせることにより得ることが可能である。リンパ球としては末梢血、リンパ節、脾臓などに由来するリンパ球を用いることができる。

【0013】EBウィルスをリンパ球に感染させ株化する方法としては例えばBoylston等の方法(Boylston, A. W., et al.: Scand. J. Immunol., 12, 355-358 (1980))が挙げられる。

【0014】細胞融合は例えばKamei等の方法(Kamei, M., et al.: Eur. J. Epidermiol., 6, 386-397 (1990))に準じて行うことができる。この際にリンパ球と融合させる株化細胞としてはヒト細胞由来のもの、特にRF-S1株等が好ましい。

【0015】EBウィルスの感染、もしくは細胞融合等によって得られた株化細胞については、まず目的とするモノクローナル抗体を産生しているか否かの検索を行う。これは、株化細胞の培養上清中の抗CEA抗体価を適当な方法、例えば酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ法等により測定することによって行なう。このようにして選択された抗CEA抗体を産生する株化細胞は、例えば限界希釈法などのクローニング操作を行うことによりクローン化することができる。このようにして得られたクローンを、例えば無血清培地(例えば基礎培地にインシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレンウム、ヒト血清アルブミンを添加した培地)中で培養を行い、培養上清を集めることによりヒト型モノクローナル抗体を得ることができる。抗体の精製は硫酸塩析法、ゲル過クロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等を組み合わせることにより容易に達成できる。

【0016】本発明のヒト型モノクローナル抗体を生産することのできる好ましいハイブリドーマは工業技術院生命工学工業技術研究所に平成5年10月25日付で寄託され、受託番号がFERM P-13920であるハイブリドーマ株BSRF-S-97である。

【0017】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。但し本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

【0018】実施例1

抗CEAモノクローナル抗体の作製

(A) ハイブリドーマの作製

子宮頸部癌患者の手術の際に得られたリンパ節から、Fi

coll-Paque(Pharmacia社、スウェーデン)を用いた密度勾配遠心分離法によりリンパ球を得た。得られたリンパ球を 5×10^5 細胞/mlとなるように、RDF培地(RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle medium, Ham's F12をそれぞれ2:1:1に混合した基礎培地)に10%の牛胎児血清(FCS)、Pokeweedマイトージエン(10,000倍希釈)(Gibco社、アメリカ)及び 5×10^{-5} Mの2-メルカプトエタノールを添加した培地に懸濁した。この細胞懸濁液を24-wellプレート(Falcon plate, Becton Dickinson and Co., アメリカ)の各ウェルに1mlずつまき37℃、5%CO₂にて5日間培養した。培養後 2.7×10^7 個の細胞が回収された。このリンパ球と 1.3×10^7 個のRF-S1細胞株(Kamei, M., et al.: Eur. J. Epidermiol., 6, 386-397 (1990))とを、ポリエチレングリコールを用いてKameiらの方法(前述)に従い細胞融合させた。融合後、細胞を15%FCS添加RDF培地に懸濁し、96ウェルプレート(Falcon)に分注し培養を行った。翌日ヒポキサンチン(100 μ M)、アミノプテリン(0.4 μ M)、チミジン(16 μ M)及び15%FCS添加RDF培地(以下HAT培地という)を加え、更に3日後にHAT培地で培地交換した。1週間後からはHAT培地からアミノプテリンを除いた培地(以下HT培地という)に培地交換し、以後3~4日おきにHT培地で培地交換を行った。細胞融合から約2週間後、融合細胞の生育が肉眼的に確認され、培養上清中の抗CEA抗体価の測定を行った。測定は酵素免疫測定法(ELISA法)により行った。

【0019】(B) ELISA法

96穴イムノプレート(MAXISORP, NUNC社、デンマーク)の各ウェルに1 μ g/mlのCEA(ヒト大腸癌の肝臓転移組織を用いてGoldとFreemanの方法(前述)を一部改変した方法にて精製)を50 μ lずつ添加し、4℃にて1晩コーティングした。リン酸緩衝生理食塩水-0.05% Tween 20 (PBS-Tween)にて1回洗浄後、0.1%牛血清アルブミン添加PBS-Tween溶液でブロッキングを行った。このようにしてCEAを固相化したプレートのウェルに、上記Aで得られたハイブリドーマの培養上清50 μ lを加えて37℃で1時間反応させた。PBS-Tweenにて洗浄後2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 山羊抗体(Tago, Inc., アメリカ)を加え、さらに37℃で1時間反応させた。洗浄後酵素基質である0.3mg/ml 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt-0.003% H₂O₂-0.1M リン酸クエン酸緩衝液(pH4.0)を100 μ l加えた。室温にて30分間反応後、100 μ lの1.5%しゅう酸溶液を加えて反応を停止し、415nmの吸光度をマイクロプレート光度計(MPR-4、東ソー株式会社)にて測定した。

【0020】(C) クローニング

上記ELISA法により陽性と判定されたウェル中の細

胞を、限界希釈法によりクローニングした。即ち、96ウェルプレートに細胞が3個、1個、0.3個となるように密度を調整して細胞を播種し、HT培地で培養する。10から14日後に細胞の生育が肉眼的に確認できるようになり、上清中の抗CEA抗体価をELISA法で測定した。すべての生育細胞が抗CEA抗体を産生していることを確認するまで、このクローニングを繰り返した。このようにして最終的にCEAに反応するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ1株(BSRF-S-97)が得られ、これが産生するモノクローナル抗体をS-97抗体と命名した。

【0021】得られたヒト型モノクローナル抗体のサブクラスをHuman IgG Subclass ELIAKit (Binding Site Co., アメリカ)により調べたところ、IgG₁であり軽鎖はκ鎖であった。

【0022】実施例2

モノクローナル抗体の反応性の検討

(A) Nonspecific crossreacting antigen (NCA)

画分との反応性

NCAは正常組織中に存在するタンパク質であり、CEAと抗原性が似ているため、抗CEAヒト型モノクローナル抗体(S-97抗体)のNCAとの交叉反応性をELISA法により調べた。この結果、S-97抗体はNCAと反応せず、CEAのみと反応することが明かとなった(図1)。

*

*【0023】(B) 各種の癌細胞株との反応性

S-97抗体の癌細胞株に対する反応性をCELL-ELISA法により調べた。方法は、種々の癌細胞株を96ウェルプレート(Falcon)にて培養し、単層に密に生育した細胞をPBSで洗浄後、冷エタノールで固定(5分、3回)した。固相化した細胞は10% FCSと0.02% アジ化ナトリウムを添加したPBS溶液中で4℃で保存し、使用直前にPBS-Tweenで3回洗浄した。以後のCELL-ELISA法は、ELISA法と同様の操作を行った。CELL-ELISAにより種々の癌細胞株に対するS-97抗体の反応性を検討した結果、本抗体はCEAを発現している癌細胞株には反応するが、CEAを発現していない癌細胞株には全く反応しないことが明かとなった(表1)。このことは本抗体がCEAに対して極めて高い特異性を有していることを示している。また表1の結果はCEAを発現している癌細胞株であっても必ずしもS-97抗体と反応するとは限らず、各細胞株の産生するCEAによって本抗体が反応するものと反応しないものが存在することを示している。このことは、後述するように本抗体がCEA中の糖鎖部分を認識するという事実から、認識糖鎖を含むCEAと、含まないCEAがあることにより説明される。

【0024】

【表1】

細胞株	CEA発現	S-97抗体の反応性(A420)
子宮体部癌細胞株		
SNG-M	—	0.000
SNG-II	—	0.003
子宮頸部癌細胞株		
SKG-I	+	0.004
SKG-II	—	0.178
SKG-IIIa	—	0.003
SKG-IIIb	—	0.002
卵巣癌細胞株		
RMUG	+	0.162
子宮筋肉腫細胞株		
SKN	—	0.000
悪性黒色腫細胞株		
GAK	—	0.004
胃癌細胞株		
MXN-45	+	0.531
大腸癌細胞株		
C-1	+	0.043
肺癌細胞株		
PC-10	+	0.568

(C) プロットティング法と免疫染色法による特異性の検討

S-97抗体がCEAに特異的であるか否かの検討を、ウェスタンプロット法により行った。胃癌細胞株であ

るMXN-45を培養しPBSにて3回洗浄後、細胞を1%SDS-8M尿素に懸濁し、100℃に10分間さらして細胞を溶解した。この様にして得られた細胞溶解液を、精製CEAおよびMXN-45の培養上清と共に8%ポリ

アクリルアミドゲル(テフコ株式会社)上で、Laemmliの方法(Laemmli, U. K.: Nature, 227, 680-685 (1970))により電気泳動した。電気泳動後、常法によりゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、免疫染色法(日本生化学会編、続生化学実験講座第2巻「タンパク質の化学(上)」, pp41-57 (1987))によりS-97抗体が反応するニトロセルロース膜上のタンパク質を調べた。1次抗体としてハイブリドーマの培養上清もしくは家兎抗CEA抗体(DAKOPATTS、デンマーク)、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG山羊抗体(Tago, Inc、アメリカ)もしくはペルオキシダーゼ標識抗家兎IgG山羊抗体(Bio-Rad Laboratories、アメリカ)を用いた。この結果S-97抗体はMKN-45の細胞中及び培養上清中のタンパク質のなかでCEAにのみ特異的に反応することが判った(図2)。

【0025】(D) S-97抗体が認識するCEA中の部位の検討

S-97抗体が認識するCEAの部位が、タンパク質であるか糖鎖であるかを調べるために、ELISA法を利用した競争阻害試験を行った。まず、ColiganとToddの方法(Coligan, J.E., and Todd, C.W.: Biochemistry, 14, 805-810 (1975))により糖鎖部分のみを分解したCEA、およびMatsuoka等の方法(Matsuoka, Y. et al.: Int. J. Cancer, 21, 604-610 (1978))によりタンパク質部分のみを分解したCEAを調製した。1次反応として25 μ lのS-97抗体溶液と25 μ lの種々の濃度の糖鎖分解CEAの混合物、もしくは25 μ lのS-97抗体溶液と25 μ lの種々の濃度のタンパク質分解CEAの混合物をC

EAをコーティングしたイムノプレートに加え実施例1(B)と同様に反応を行った。この結果プレートにコートされたCEAとS-97抗体の反応は、糖鎖部分のみを分解したCEAによっては阻害されず、逆にタンパク質部分のみを分解したCEAを加えることにより阻害された(図3、図4)。このことからS-97抗体はCEA中の糖鎖部分を特異的に認識することが証明された。

【0026】

【発明の効果】本発明による抗CEAヒト型モノクローナル抗体はCEA中の糖鎖部分を特異的に認識するので、放射性物質を結合させ癌患者の腫瘍の位置を調べるイメージング剤、あるいは抗癌物質と本発明抗体を結合させ癌を治療するいわゆるミサイル療法等に応用が可能である。本発明の抗体はヒトに対する抗原性が低いヒト型のモノクローナル抗体であるため、臨床上極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

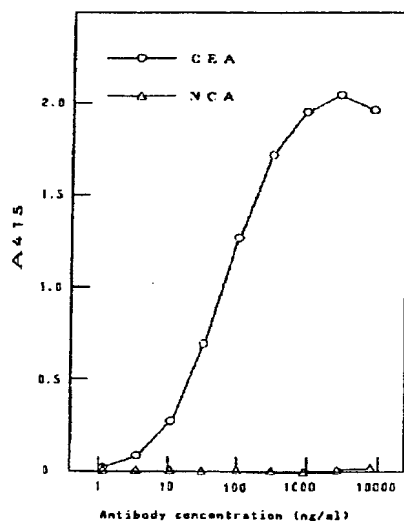
【図1】図1は、本発明モノクローナル抗体のCEA及びNCAとの反応性を示す。

【図2】図2は、本発明モノクローナル抗体のCEAに対する特異性を示すウェスタンブロット後の免疫染色法における電気泳動の写真である。

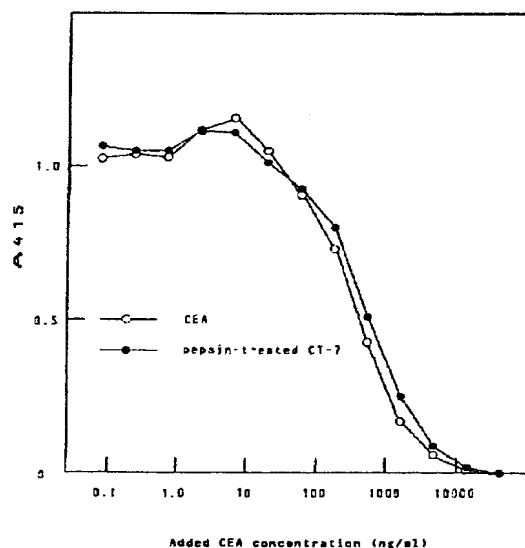
【図3】図3は、本発明モノクローナル抗体とCEAの反応に対するタンパク分解CEAの競争阻害試験の結果を示す。

【図4】図4は、本発明モノクローナル抗体とCEAの反応に対する糖鎖分解CEAの競争阻害試験の結果を示す。

【図1】



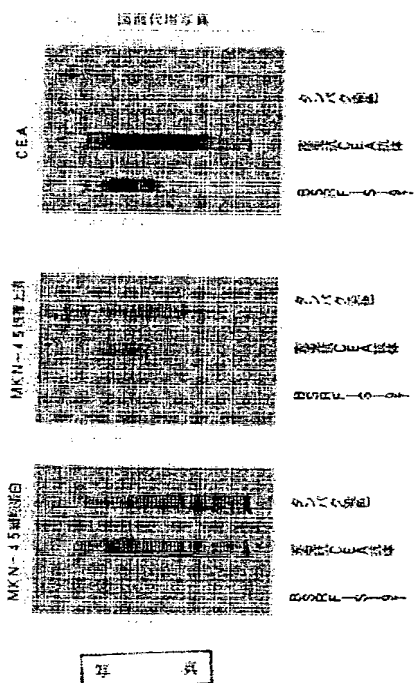
【図3】



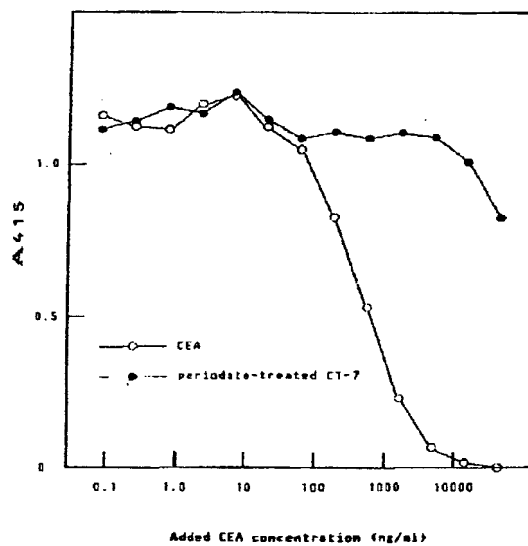
(6)

特開平7-126299

【図2】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵
 // A61K 39/395
 C12N 15/02
 G01N 33/574
 33/577
 (C12P 21/08
 C12R 1:91)

識別記号 庁内整理番号
 ADU T
 E
 B

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 橋爪 秀一
 神奈川県横浜市金沢区並木 3-7-4-
 1303